

Effet de la conservation et
mode de préparation optimal
pour la mesure des sulfures
dans des échantillons d'eaux

Et

Effet des sulfures sur la
mesure de l'ammonium dans
des échantillons d'eaux par
fluorescence

1. Conditionnement et mesure des sulfures.....	5
1.1. Principe	5
1.2. Calibration solutions mères de sulfures	5
1.2.1. Principe	6
1.2.2. Mode opératoire.....	6
1.2.3. Résultats	6
1.3. Gamme étalonnage.....	7
1.3.1. Principe	7
1.3.2. Mode opératoire.....	8
1.3.3. Résultats	9
1.3.3.1. Cuve de 1cm	9
1.3.3.2. Cuve de 5cm	10
1.4. Préparation des échantillons et conservation	10
1.4.1. Dilution de l'échantillon	10
1.4.2. Conservation.....	11
1.4.3. Volume de réactifs	12
2. Effet des sulfures sur la mesure d'ammonium	13
2.1. Présentation	13
2.2. Principe	13
2.3. Mode opératoire	14
2.3.1. Calibration	14
2.3.1.1. Principe	14
2.3.1.2. Résultats	15
2.3.2. Tests sulfures.....	16
2.3.2.1. Mode opératoire	16
2.3.2.2. Résultats	16
2.3.2.3. Résultats acidifiés.....	17
2.4. Validation de la méthode	17
2.4.1. Intercalibration	18
2.4.2. Essais Inter Laboratoire	19
3. Conclusion	19
4. Annexe n° 1 : Résultats de l'ammonium en présence de sulfures	20
4.1. Test avec 10µM d'ammonium	20
4.2. Test avec 25µM d'ammonium	21
4.3. Test avec 50µM d'ammonium	22
5. Bibliographie	23

Liste des figures et tableaux

<u>Tableau n° 1</u> : Résultats des droites d'étalonnage de Na ₂ S, 7/9 H ₂ O	9
<u>Tableau n° 2</u> : Résultats des différentes dilutions des échantillons de sulfures	11
<u>Tableau n° 3</u> : Résultats de la conservation des sulfures avec et sans ZnCl ₂	12
<u>Tableau n° 4</u> : Résultats de l'absorbance en fonction des volumes de réactifs	12
<u>Tableau n° 5</u> : Points de gammes dans l'eau MilliQ	14
<u>Tableau n° 6</u> : Résultats Fluorescence des points de gamme dans l'eau MilliQ	15
<u>Tableau n° 7</u> : Equation des droites des pertes de signaux en fonction des sulfures	17
<u>Tableau n° 8</u> : Résultats intercalibration Technicon / Méthode manuelle	18
<u>Tableau n° 9</u> : Résultats EIL	19
<u>Tableau n° 10</u> : Résultats des échantillons de 10µM NH ₄ ⁺ dopées en sulfures	20
<u>Tableau n° 11</u> : Résultats des échantillons de 25µM NH ₄ ⁺ dopées en sulfures	21
<u>Tableau n° 12</u> : Résultats des échantillons de 50µM NH ₄ ⁺ dopés en sulfures	22
<u>Figure n° 1</u> : Droites de calibration pour la solution Na ₂ S, 7/9 H ₂ O	7
<u>Figure n° 2</u> : Droites d'étalonnage avec une cuve de 1cm	9
<u>Figure n° 3</u> : Droites d'étalonnage avec une cuve de 5cm	10
<u>Figure n° 4</u> : Résultats de l'absorbance en fonction des volumes de réactifs	13
<u>Figure n° 5</u> : Droite d'étalonnage de l'ammonium	15
<u>Figure n° 6</u> : Résultats intercalibration Technicon / Méthode manuelle	18
<u>Figure n° 7</u> : Résultats intercalibration Technicon / Méthode manuelle	18
<u>Figure n° 8</u> : Perte du signal pour 10µM NH ₄ ⁺ en fonction des sulfures	20
<u>Figure n° 9</u> : Perte du signal pour 25µM NH ₄ ⁺ en fonction des sulfures	21
<u>Figure n° 10</u> : Perte du signal pour 50µM NH ₄ ⁺ en fonction des sulfures	22

1. Conditionnement et mesure des sulfures

1.1. Principe

Lors des campagnes océanographiques les échantillons de sulfures sont conditionnés à bord dans des flacons fermés préalablement purgés à l'azote puis conservés à l'obscurité et à 4°C. Une fois au laboratoire, en les pesant et en soustrayant le volume de chlorure de zinc ajouté, nous pouvons calculer le volume exact d'échantillons. Ce volume est très important pour le calcul de la concentration en sulfures dans l'échantillon.

La gamme de linéarité de notre méthode n'excède pas 150 µmol/L. Dans des environnements particuliers étudiés comme des écosystèmes chimiosynthétiques, les teneurs en sulfures peuvent être très importantes (de l'ordre de quelques mM), il est donc nécessaire de diluer l'échantillon. Or, nous ignorons avant l'ajout des réactifs, si les concentrations seront fortes. De plus, pour limiter les pertes et les incertitudes, il est préférable de ne pas ouvrir les flacons pour ajouter les réactifs, ni de prélever un volume plus ou moins précis de l'échantillon.

La solution la plus adéquate serait donc de pouvoir diluer l'échantillon après ajout des réactifs. Or la dilution de l'échantillon entraîne une sous-estimation de la concentration.

Le but de ses essais est donc de déterminer si l'ajout d'eau désoxygénée juste après les réactifs et avant incubation, impacte l'absorbance mesurée.

De plus les sulfures étant très instables, nous vérifierons que le temps de conservation des échantillons n'engendre pas des pertes.

1.2. Calibration solutions mères de sulfures

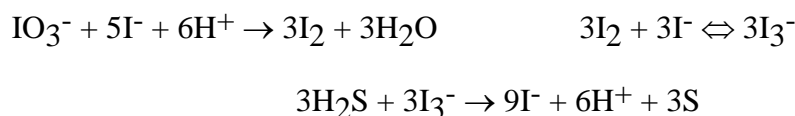
Pour la mesure des échantillons de sulfures, une solution mère a été préparée par pesée de Na₂S, 7/9 hydratées VWR® (CAS : 28164,232). Cette solution pouvant contenir des impuretés, il est important de la calibrer et de déterminer le titre exact de cette solution.

Pour la mesure des échantillons de sulfures, une solution mère a été préparée par pesée de Na₂S, 7/9 hydratées VWR® (CAS : 28164,232). Cette solution pouvant

contenir des impuretés, il est important de la calibrer et de déterminer le titre exact de cette solution.

1.2.1. Principe

L'ion triiodure (I_3^-) est formé par réaction d'une solution étalon d'iodate en présence d'un excès d'iodure en milieu acide. I_3^- , de couleur jaune, est ensuite neutralisé par les sulfures pour former I^- (iodure), incolore.



1.2.2. Mode opératoire

A 20 mL d'eau MilliQ, il faut ajouter 1mL de KI à 100 mg.mL⁻¹ ainsi que 1mL de KIO₃ à 1,667 mmol.L⁻¹ excepté pour le blanc. Ensuite on ajoute 0,5 mL d'H₂SO₄ à 5% et un volume de solution de Na₂S à calibrer. Une fois le flacon fermé, il est indispensable de le protéger de la lumière pour éviter l'oxydation photochimique de I_3^- . L'absorbance est mesurée à 400 nm.

Les absorbances des échantillons sont corrigées de la valeur du blanc. La représentation graphique des absorbances mesurées, par rapport aux volumes de Na₂S ajoutés, permet de déterminer V_{eq}, volume de Na₂S nécessaire pour la neutralisation de I_3^- (absorbance nulle).

L'équation ci-dessous permet le calcul de la concentration de Na₂S en fonction du V_{eq} déterminé.

$$[Na_2S] = 3 \cdot 1000 [KIO_3] / V_{eq}$$

$$[KIO_3] = 1,667 \text{ mmol.L}^{-1} \quad V_{eq} \text{ en } \mu\text{l} \quad [Na_2S] \text{ en mmol.L}^{-1}$$

1.2.3. Résultats

Nous avons utilisé une solution mère de Na₂S 7/9 hydratée.

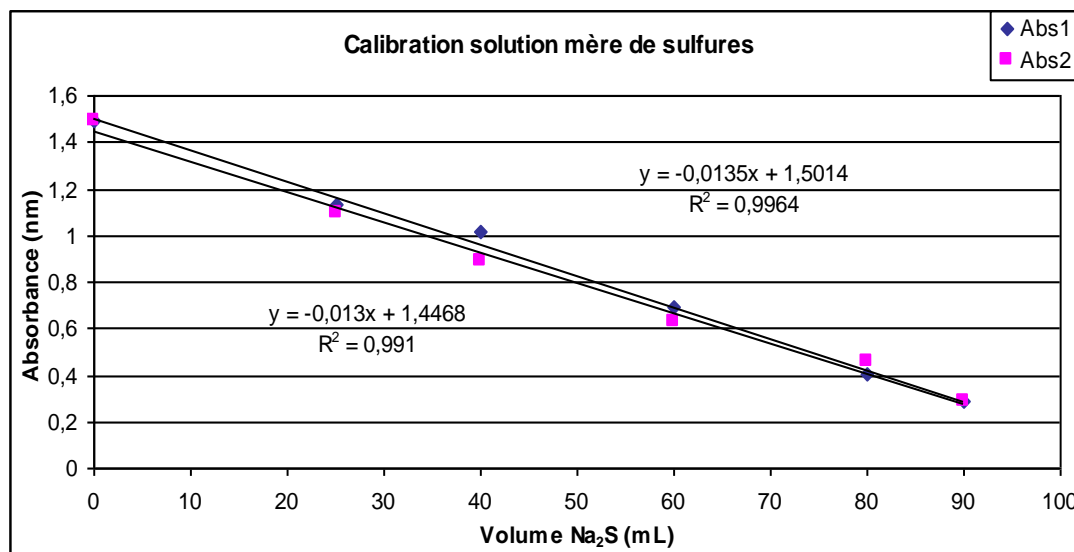


Figure n° 1 : Droites de calibration pour la solution Na₂S, 7/9 H₂O

$$\text{Equation 1 : } y = -0,0123x + 1,3536 \quad \text{pour } R^2 = 0,99$$

$$\text{D'après l'équation ci-dessus : } V_{eq1} = 110,05 \text{ mL} \quad C_1 = 45,44 \text{ mmol.L}^{-1}$$

$$\text{Equation 2 : } y = -0,0123x + 1,3641 \quad \text{pour } R^2 = 0,99$$

$$\text{D'après l'équation ci-dessus : } V_{eq2} = 110,90 \text{ mL} \quad C_2 = 45,09 \text{ mmol.L}^{-1}$$

La concentration moyenne en Na₂S, 7/9 H₂O de la solution mère estimée à ~ 65 mM est donc de **45,3 ± 0,2 mM**. Cette même solution mère a été utilisée pour les tests de l'effet des sulfures sur la réponse de l'azote ammoniacal en fluorimétrie.

1.3. Gamme étalonnage

1.3.1. Principe

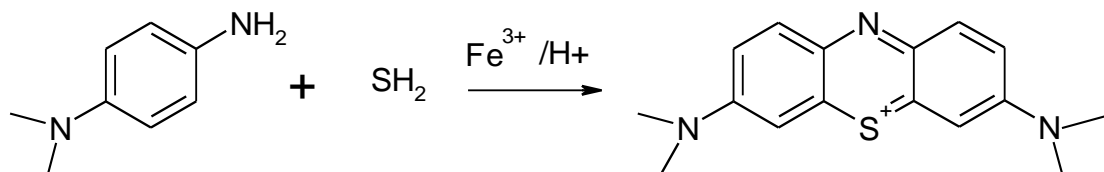
Pour la mesure des sulfures dans des échantillons d'eaux, la méthode utilisée (Fonselius, 1983) prend en compte tous les sulfures.

$$[S]_{\text{total}} = [H_2S] + [HS^-] + [S^{2-}]$$

Lors des prélèvements, les échantillons sont conditionnés dans 1mL de chlorure de zinc (1 mol.L⁻¹) qui permet de fixer les sulfures, puis sont conservés à 4°C avant l'analyse.

Pour le dosage des sulfures dans les eaux, le chlorure ferrique à 100 mmol.L^{-1} et le N, N-diméthyl-p-phénylènediamine dihydrochloride $(\text{CH}_3)_2\text{NC}_6\text{H}_4\text{NH}_2, 2\text{HCl}$ à 19 mmol.L^{-1} réagissent avec les sulfures pour donner un précipité bleu après un temps d'incubation de 1h.

Les réactifs sont conservés dans de l'acide chlorhydrique 6N et sont stockés dans des flacons de pénicilline protégés de la lumière au réfrigérateur.



Les mesures se font par spectrophotométrie d'absorption dans le visible à 670nm , à l'aide d'un spectrophotomètre CARY 1C Agilent®.

La coloration du complexe est stable durant quelques jours (perte de 5% après une semaine).

1.3.2. Mode opératoire

La solution mère que nous allons utiliser est la solution de Na_2S , 7/9 hydratée calibrée précédemment. La gamme de linéarité n'allant que jusqu'à $150 \mu\text{mol.L}^{-1}$, il sera nécessaire de préparer une solution fille diluée par 100 pour préparer la gamme d'étalonnage.

On utilise de l'eau désoxygénée car l'oxygène interfère avec la réaction. On effectue un bullage à l'azote dans de l'eau MilliQ placée aux ultrasons durant environ 20min.

Pour 10mL d'échantillon on ajoute $100\mu\text{L}$ de chlorure ferrique et $100\mu\text{L}$ de N, N-diméthyl-p-phénylènediamine dihydrochloride (10/0,1/0,1). Après agitation, la réaction colorimétrique se fait durant 1h à l'obscurité.

Pour un trajet optique de 1cm, la limite de quantification est comprise entre 5 et $10\mu\text{M}$ pour une gamme de linéarité allant jusqu'à $150\mu\text{M}$. Pour un trajet optique de 5cm, la limite de quantification est de $1\mu\text{M}$ pour une linéarité jusqu'à $75\mu\text{M}$.

L'absorbance des témoins étant corrigée du blanc, la droite passe par l'origine.

1.3.3. Résultats

Afin d'augmenter la limite de quantification qui est pour une cuve de 1cm comprise entre 5 et 10 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, nous avons effectué plusieurs essais avec différents trajets optiques (Tableau n° 1).

Fille = 452,7 $\mu\text{mol/L}$									
Echantillons	Blc	Te 1	Te 2	Te 3	Te 4	Te 5	Te 6	Te 7	Te 8
[Na ₂ S] $\mu\text{mol/L}$	0	1	2	5	10	25	50	100	150
Abs 1 cuve 1cm	0	0,032	0,0706	0,0985	0,1732	0,4195	0,8091	1,3964	1,9384
Abs 2 cuve 1cm	0	0,0358	0,051	0,0894	0,1735	0,4302	0,8117	1,3689	1,9188
Abs 1 cuve 5cm	0	0,1247	0,2082	0,4509	0,7254	1,964	3,5802		
Abs 2 cuve 5cm	0	0,1147	0,2083	0,4776	0,8454	2,0175	3,6493		
Abs 1 cuve 10cm	0	0,2561	0,3931	0,9581	1,5826	3,7123			

Tableau n° 1 : Résultats des droites d'étalonnage de Na₂S, 7/9 H₂O

1.3.3.1. Cuve de 1cm

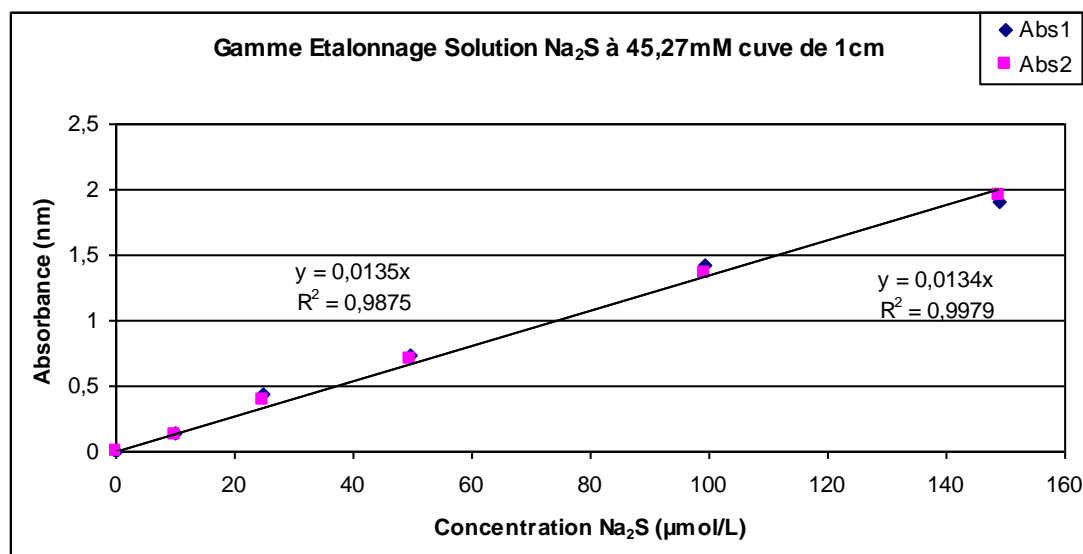


Figure n° 2 : Droites d'étalonnage effectuées avec la solution 7/9 hydratée avec une cuve de 1cm

$$\text{Equation de la droite 1 : } y = 0,0135 x \quad R^2 = 0,99$$

$$\text{Equation de la droite 2 : } y = 0,0134 x \quad R^2 = 0,99$$

L'équation moyenne de la gamme d'étalonnage de Na₂S est donc : $y = 0,01345x \pm 0,00007$ pour un trajet optique de 1cm.

1.3.3.2. Cuve de 5cm

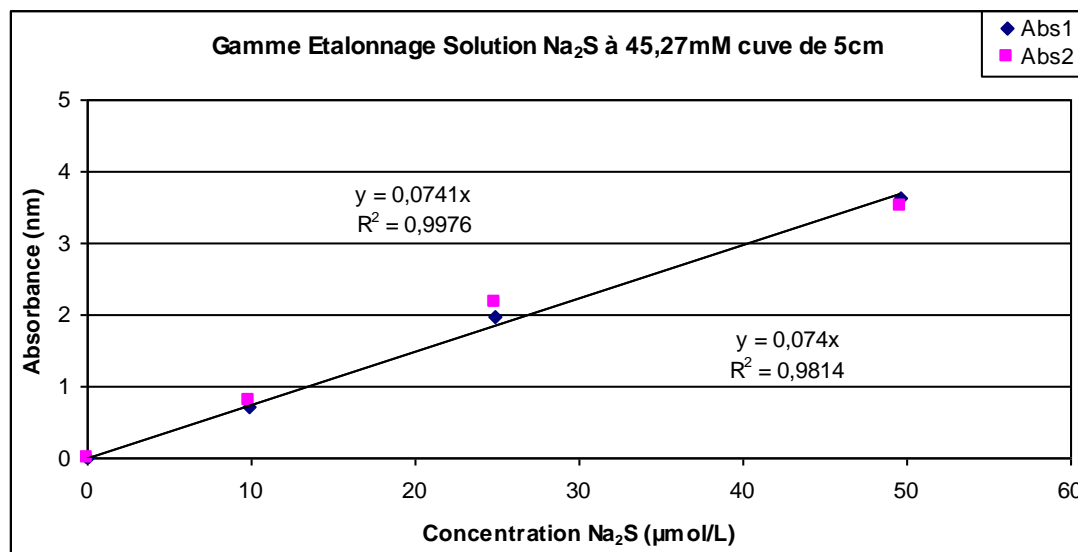


Figure n° 3 : Droites d'étalonnage effectuées avec la solution 7/9 hydratée avec une cuve de 5cm

Equation de la droite 1 : $y = 0,0732 x$ $R^2 = 0,99$

Equation de la droite 2 : $y = 0,0750 x$ $R^2 = 0,99$

L'équation moyenne de la gamme d'étalonnage de Na₂S est donc : $y = 0,0741x \pm 0,0013$ pour un trajet optique de 5cm.

La limite de linéarité de la gamme d'étalonnage se situe à 50µM avec une cuve de 5 cm mais permet une limite de quantification de l'ordre d'1µM.

1.4. Préparation des échantillons et conservation

Nous avons effectué plusieurs essais de conservation des échantillons et vérifié si l'ordre d'ajout des réactifs et de l'eau désoxygénée, lorsque l'échantillon doit être dilué, impacte l'absorbance mesurée.

1.4.1. Dilution de l'échantillon

Une solution à 25µM a été préparée puis diluée par 2 pour les tests. Le calcul des concentrations prend en compte le facteur de dilution. (Tableau n° 2).

- Test 1 : témoin : Le test 1 est préparé suivant la méthode classique, la dilution est effectuée avant ajout des réactifs.
- Test 2 : Les réactifs sont introduits dans l'échantillon puis on rajoute immédiatement l'eau désoxygénée

- Test 3 : L'échantillon est dilué après l'ajout des réactifs et l'incubation de 1h
- Test 4 : Avant l'ajout des réactifs, nous prélevons dans un eppendorf 100 μ L de l'échantillon puis ajoutons les réactifs afin d'estimer la concentration en sulfures puis nous préparons l'échantillon suivant le test 1.

	Test 1 = Temoin	Test 2	Test 3	Test 4
Solution 25 μ M dilué par 2	Dilution avant réactif	Dilution après réactif	Dilution après réaction	Prélèvement 100 μ L puis dilution
Cuve 1cm				
Abs 1	0,1675	0,2513	0,2533	0,1591
[Na ₂ S] 1 μ mol/L	25,16	37,74	38,04	24,14
Abs 2	0,1666	0,2533	0,2519	0,1573
[Na ₂ S] 2 μ mol/L	25,02	38,04	37,83	23,87
[Na ₂ S] moy μ mol/L	25,09	37,89	37,94	24,00
Ecart type	0,10	0,21	0,15	0,19
différence cuve 1cm en %	0	51	51	4
Cuve 5cm				
Abs 1	0,9233	1,3926	1,4034	0,9262
[Na ₂ S] 1 μ mol/L	25,19	37,99	38,28	25,53
Abs 2	0,9377	1,3941	1,3976	0,9256
[Na ₂ S] 2 μ mol/L	25,58	38,03	38,12	25,25
[Na ₂ S] moy μ mol/L	25,38	38,01	38,20	25,39
Ecart type	0,28	0,03	0,11	0,20
différence cuve 5cm en %	0	50	51	0
Différence moyenne en %	0	50	51	2

Tableau n° 2 : Résultats des différentes dilutions des échantillons de sulfures

Nous pouvons observer que lorsque l'on rajoute les réactifs avant de diluer les échantillons, les résultats sont majorés d'environ 50% avant et après incubation. Comme observées par Fonselius et Cline les lois de dilution ne sont pas respectées sur le composé formé.

La solution adéquate pour la préparation des échantillons est donc de prélever 100 μ L et d'y ajouter les réactifs afin de pouvoir faire une approximation de la concentration et ensuite de faire la dilution nécessaire pour que l'échantillon rentre dans la gamme de linéarité.

1.4.2. Conservation

Afin de confirmer qu'il n'existe pas ou très peu de perte lors de la conservation de l'échantillon, nous avons préparé plusieurs témoins de concentrations connues de manière identique (ajout de 1mL de ZnCl₂, flacons préalablement purgés à

l'azote, puis conditionnés à l'obscurité et à 4°C). Nous les avons laissés une semaine au frais puis analysés comme des échantillons classiques (Tableau n° 3).

	Test 1 = Temoin		Test 2 = Temoin		Test 3		Test 4	
	Témoins avec ZnCl ₂		Témoins sans ZnCl ₂		Avec ZnCl ₂ après 1semaine (4°C)		Sans ZnCl ₂ après 1semaine (4°C) au frais	
Cuve 1cm	a	b	a	b	a	b	a	b
m fl plein (g)	17,216	17,196	17,956	17,723	17,350	17,392	16,406	16,293
m fl vide (g)	11,100	11,109	12,713	12,640	11,248	11,240	11,313	11,140
m éch (g)	6,116	6,087	5,243	5,084	6,102	6,152	5,092	5,153
V Zn (mL)	1	1	0	0	1	1	0	0
V d'eau (mL)	5,011	4,982	5,243	5,084	4,997	5,048	5,092	5,153
Abs (nm)	0,8529	0,8507	1,0037	1,0067	0,8518	0,8545	0,8198	0,8152
[Na ₂ S] µmol/L	76,07	75,94	74,62	74,85	76,00	76,12	60,95	60,61
[Na ₂ S] moy µmol/L	76,01		74,74		76,06		60,78	
Ecart type	0,09		0,16		0,08		0,24	
[Na ₂ S] moy µmol/L	75,37							
Ecart type	0,74							
Perte moyenne %					0		19,36	

Tableau n° 3 : Résultats de la conservation des échantillons de sulfures avec et sans ZnCl₂

Nous pouvons remarquer que les témoins sont identiques, qu'il y ait ou non, du chlorure de zinc (analyses immédiates). Après 1 semaine de conservation à 4°C et à l'obscurité, le chlorure de zinc, qui fixe les sulfures, permet de ne pas avoir de perte au cours du temps. En revanche l'absence de chlorure de zinc a fait perdre près de 20% des sulfures présents initialement dans l'échantillon.

1.4.3. Volume de réactifs

Afin de vérifier si les réactifs sont présents en excès dans la méthode nous avons introduit différents volumes de ceux-ci dans des échantillons de 10mL à 50µM (Tableau n° 4).

Echantillons	Blc	Te 1	Te 2	Te 3	Te 4
VOLUME réactif mL		0,05	0,1	0,2	0,5
Proportion		200	100	50	20
Abs 1 cuve 1cm	0	0,3336	0,391	0,6181	1,042
Abs 2 cuve 1cm	0	0,3797	0,408	0,5708	1,0814
Moyenne Abs		0,35665	0,3995	0,59445	1,0617

Tableau n° 4 : Résultats de l'absorbance en fonction des volumes de réactifs

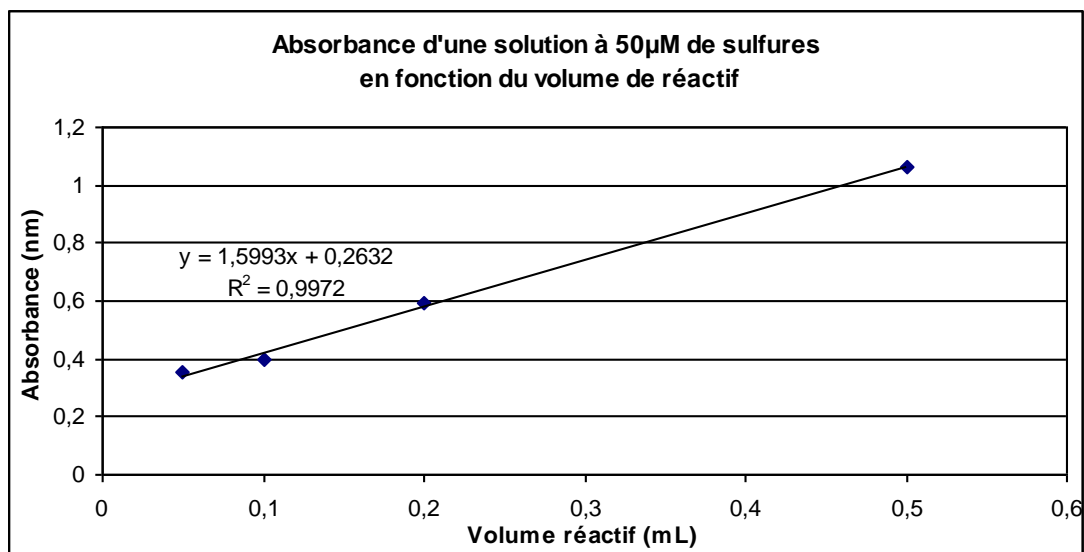


Figure n° 4 : Résultats de l'absorbance en fonction des volumes de réactifs

Nous remarquons que l'absorbance est fonction de la proportion entre échantillon et réactifs. Il est donc indispensable de respecter la même proportion entre les témoins et les échantillons mesurés. La méthode utilisée est un rapport de 10/0,1/0,1.

Des tests supplémentaires seraient intéressants afin de déterminer la gamme de linéarité et la limite de détection pour des proportions en réactifs différents afin d'optimiser l'analyse.

2. Effet des sulfures sur la mesure d'ammonium

2.1. Présentation

D'après une étude d'Aminot et Kerouel, (2007) les sulfures réduisent l'intensité du signal, linéairement en fonction de leurs concentrations, à raison d'une perte de signal d'environ 1% tous les 4 μ mol/L de sulfures. Dans les eaux interstitielles étudiées nous retrouvons des sulfures en très grande quantité (Campagnes : BIG, WACS, Congolobe), cet effet peut donc représenter une interférence majeure sur nos mesures. Nous avons donc effectué des tests avec différentes concentrations en sulfures et ammonium.

2.2. Principe

La méthode généralement utilisée pour la détermination de l'ammonium est celle au bleu d'indophénol, cette méthode n'est pas extrêmement fiable notamment pour de faibles concentrations en ammonium. La mesure par fluorescence décrite

par Holmes (1999) permet la détection d'ammonium à des concentrations de l'ordre de $1 \mu\text{mol.L}^{-1}$.

Cette technique utilise un réactif appelé WR qui est un mélange de 2L de solution tampon borate à 40 g.L^{-1} , 10mL de sulfite de sodium à $0,040 \text{ g.L}^{-1}$ dans le réactif et 100mL d'orthophthaldialdéhyde (OPA) à 2 g.L^{-1} .

Le principe de la réaction de l'ammonium avec le réactif WR est que les ions ammonium réagissent avec l'OPA en présence d'un réducteur (sulfite) en milieu basique ($\text{pH} = 9,2$) tamponné par le tétraborate de sodium.

L'OPA est également utilisé pour mesurer les acides aminés mais en présence de sulfite de sodium, il devient spécifique à l'ammonium.

2.3. Mode opératoire

2.3.1. Calibration

2.3.1.1. Principe

Tous les flacons sont rincés à l'acide chlorhydrique à 1M puis à l'eau MilliQ avant utilisation.

La gamme étalon est effectuée avec une solution mère de sulfate d'ammonium à 1mM (Tableau n° 5). On complète le volume d'ammonium à 1mL avec de l'eau MilliQ, on ajoute ensuite 4mL de réactif WR. Une fois agités, les échantillons sont stockés à l'obscurité. Le temps d'incubation est de minimum 2 à 3h et ne doit pas excéder 8h pour une fluorescence optimale.

Témoins	MilliQ	Blc	Te1	Te2	Te3	Te4	Te5	Te6	Te7	Te8
$[\text{NH}_4^+] \mu\text{mol/L}$	0	0	1	5	10	25	50	100	150	200
Volume NH_4^+ (μL)	0	0	1	5	10	25	50	100	150	200
MilliQ (μL)	5000	1000	999	994	984	959	909	809	659	459
Volume WR mL	0	4	4	4	4	4	4	4	4	4

Tableau n° 5 : Points de gammes dans l'eau MilliQ

Le blanc MilliQ sert uniquement pour le réglage du zéro de l'appareil.

Le spectrofluorimètre utilisé est un appareil Jasco 920 dont le gain est fixé à 1, l'atténuation de 16, la longueur d'onde d'excitation est de 365nm et celle d'émission de 465nm.

Une étude ultérieure (De Prunéné, 2010) indiquait que l'utilisation d'une cellule en flux n'altérait pas la mesure. Après quelques essais avec le fluorimètre à un débit constant de 4 mL/min, nous avons constaté une mauvaise stabilité du signal. Nous avons donc effectué nos mesures avec une cuve statique de 1cm de trajet optique.

La salinité pouvant interférer sur la fluorescence, nous avons comparé une gamme faite dans de l'eau MilliQ et une dans de l'eau de mer standard à 35‰. A la concentration choisie, la salinité n'a pas de conséquence sur la fluorescence. De plus une majorité des échantillons devant être diluée à l'eau MilliQ, l'« effet de sel » sera donc négligeable dans notre étude.

2.3.1.2. Résultats

Témoins	[NH4+] μmol/L	Fluorescence Moyenne	Ecart type
B1c	0	0,0000	0,0000
Te1	1	0,0097	0,0004
Te2	5	0,0456	0,0034
Te3	10	0,0988	0,0068
Te4	20	0,1776	0,0122
Te5	25	0,2245	0,0036
Te6	50	0,3916	0,0149
Te7	75	0,5314	0,0110
Te8	100	0,6433	0,0108
Te9	125	0,7209	0,0131
Te10	150	0,7901	0,0181
Te11	200	0,8807	0,0002

Tableau n° 6 : Résultats Fluorescence des points de gamme dans l'eau MilliQ

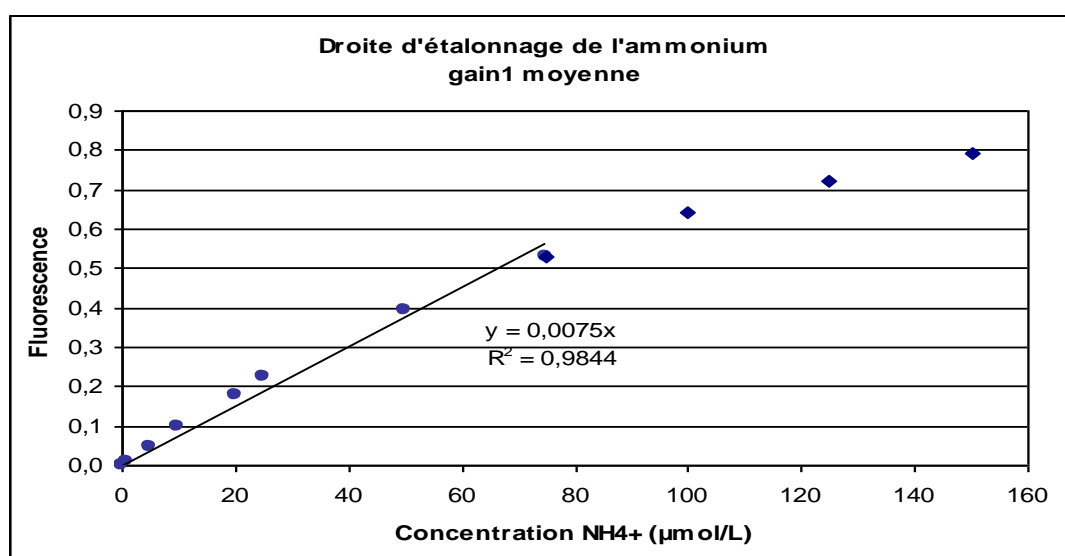


Figure n° 5 : Droite d'étalonnage de l'ammonium

Nous remarquons que les fluorescences obtenues au dessus de $75\mu\text{mol/L}$ sont trop faibles (Figure n° 5), nous décidons donc de considérer que la limite de linéarité n'exécède pas $75\mu\text{M}$.

Equation de la droite d'étalonnage: $y = 0,0075 x$ pour un $R^2 = 0,9844$

Le blanc étant soustrait aux échantillons, la droite d'étalonnage passe par l'origine.

2.3.2. Tests sulfures

2.3.2.1. Mode opératoire

Afin de vérifier l'effet des sulfures sur la mesure de l'ammonium, nous avons préparé plusieurs standards à des teneurs en sulfures (de 0 à $40000\mu\text{M}$) et d'ammonium (10, 25 et $50\mu\text{M}$) différentes correspondant à la gamme des échantillons analysés. La solution en sulfures est la solution de Na_2S , 7/9 hydratée préalablement étalonnée en spectrophotométrie.

2.3.2.2. Résultats

Après incubation nous avons mesuré les fluorescences des différents échantillons. (Annexe n° 1). Le blanc de la mesure est de 0,0040.

On remarque que l'effet des sulfures sur la fluorescence est important. En effet, lorsque les sulfures sont compris entre $10\mu\text{M}$ à $2000\mu\text{M}$, la perte de signal se situe entre 5 et 45%. Pour des concentrations entre 2 et 10mM , la perte du signal se situe entre 45 et 88 %. De plus, au delà de 10mM , la perte de signal est telle que la fluorescence n'est presque plus visible, il sera donc impossible d'effectuer une correction pour ces échantillons. La solution la plus adéquate est donc de diluer les échantillons contenant plus de 10mM de sulfures.

En revanche, pour ceux inférieurs à 10mM en H_2S dans le flacon, c'est-à-dire en tenant compte de la dilution effectuée pour l'analyse, différentes corrections seront applicables suivant la teneur en sulfures.

Enfin, les trois essais à des teneurs en ammonium différentes, nous montrent les mêmes pourcentages de perte de fluorescence, ce qui nous indique que la diminution de signal est uniquement due aux sulfures et que la correction sera valable quelles que soient les teneurs en ammonium (Tableau n° 7).

	10µM NH4+	
[H2S] µM	y = ax + b	
de 0 à 2000	0,0253	
de 2000 à 10000	0,0055	35,639
< 10000	0	99,757

	25µM NH4+	
[H2S] µM	y = ax + b	
de 0 à 2000		
de 2000 à 10000	0,0252	
< 10000	0,0052	37,135
	0,00009	94,416

	50µM NH4+	
[H2S] µM	y = ax + b	
de 0 à 2000	0,0254	
de 2000 à 10000	0,0049	39,783
< 10000	0,0001	94,398

	Moyenne a	Ecart type	Moyenne b	Ecart type
[H2S] µM	y = ax		+ b	
de 0 à 2000	0,0253	0,0001		0,0001
de 2000 à 10000	0,0052	0,0003	37,519	2,0985
< 10000	0,00006	0,0001	96,190	3,0888

Tableau n° 7 : Equation des droites des pertes de signaux en fonction des sulfures

2.3.2.3. Résultats acidifiés

Lorsque l'on acidifie les échantillons, toutes les formes de sulfures se transforment en H₂S gazeux. Théoriquement, si les échantillons sont acidifiés et agités avant analyse, les effets des sulfures seront minimisés.

Nous pouvons observer que malgré l'ajout d'acide chlorhydrique le signal est tout de même diminué par la présence de sulfures.

La correction établie avec des échantillons non acidifiés sera donc aussi applicable pour des échantillons acidifiés.

2.4. Validation de la méthode

Afin de confirmer les résultats obtenus, nous avons effectué une intercalibration sur quelques échantillons à l'aide d'un Technicon par R. Kerouël, Ifremer/Dyneco. Nous avons choisi des échantillons de la campagne BIG, avec des points hauts (CalB PL1764) et des points bas (CalB PL1768) (Tableau n° 8).

Nous avons ensuite analysé des échantillons entrant dans le cadre d'un EIL (Exercice Inter Laboratoires) pour valider la méthode.

2.4.1. Intercalibration

Campagne BIG	NH ₄ ⁺ (µM) corr de H ₂ S		Biais %	
	Manuel	Technicon		
CALB PL 1764	Southern Trough (chaud) BIG 6			
Sédiment Morelos	B1	0,0	0,1	
	B2	56,8	58,5	3,0
	B3	116,1	121,9	4,8
	B4	164,6	173,8	5,3
	B5	309,8	331,4	6,5
	B6	482,1	519,4	7,2
CALB PL 1768	Southern Trough (chaud) BIG 10			
Vésicomydés Morelos	CB2	<1 µmol/L	0,01	
	CB3	<1 µmol/L	0,01	
Moyenne %			5,3	
Ecart type			1,6	

Tableau n° 8 : Résultats intercalibration Technicon / Méthode manuelle

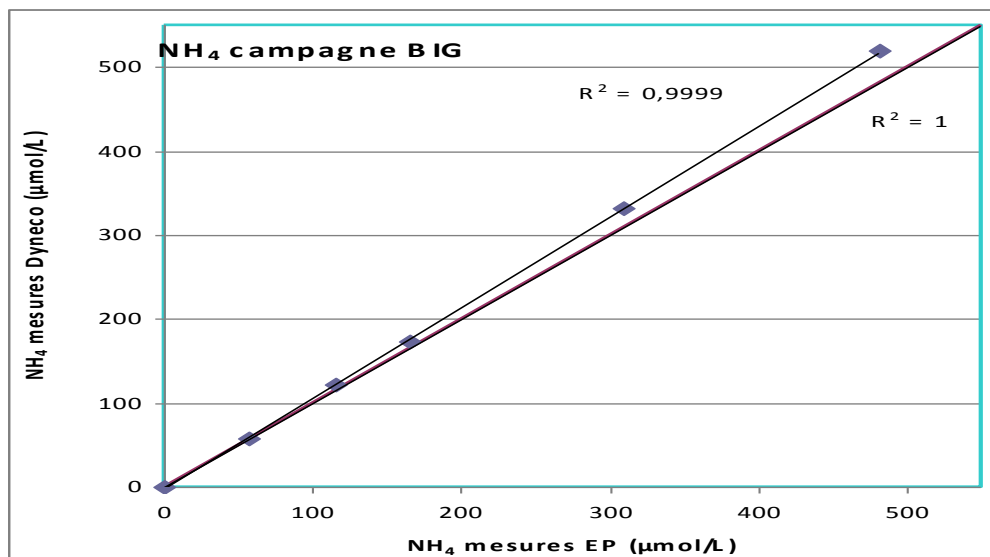


Figure n° 6 : Résultats intercalibration Technicon / Méthode manuelle

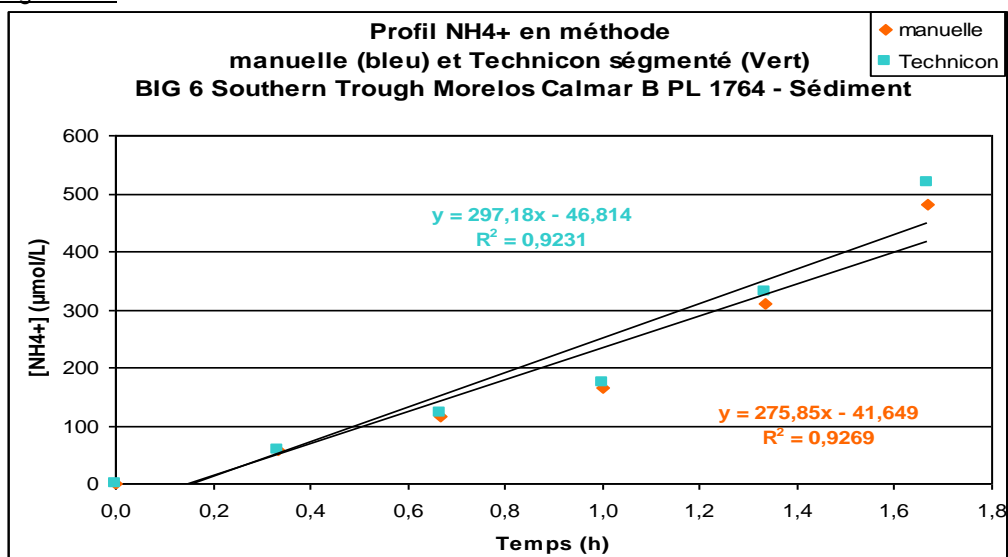


Figure n° 7 : Résultats intercalibration Technicon / Méthode manuelle

Nous pouvons en conclure qu'il y a un léger biais entre les 2 méthodes (environ 5%). Compte tenu de la différence de sensibilité des techniques, nous pouvons considérer que les résultats obtenus avec la méthode manuelle décrite précédemment sont valables.

2.4.2. Essais Inter Laboratoire

Les Essais Inter Laboratoires (EIL) font l'objet d'une étude de contrôle de plusieurs laboratoires. Nous avons analysé les mêmes échantillons pour valider la méthode et confirmer sa fiabilité et sa justesse. Les résultats obtenus sont présents sur le Tableau n° 9 ci-dessous.

EIL	Valeur référence	Gain 1			Gain 10		
		mesure manuel	entre ref et mesure		mesure manuel	entre ref et mesure	
	technicon	+/- Ecart type	Ecart μM	Ecart %	+/- Ecart type	Ecart μM	Ecart %
lot 1	3,56	3,26 +/- 0,19	0,30	8,5	3,26 +/- 0,19	0,79	22,2
lot 2	0,28	0,38 +/- 0,10	0,10	27,1	0,38 +/- 0,10	0,04	14,1

Tableau n° 9 : Résultats EIL

Nous pouvons observer que les valeurs obtenues sont valables. En ce qui concerne le lot 2, la concentration est en dessous de la limite de quantification de la méthode utilisée, les résultats ne peuvent donc pas être pris en compte.

3. Conclusion

En ce qui concerne la conservation des sulfures, l'ajout de chlorure de zinc est indispensable pour une bonne conservation de l'échantillon.

De plus, pour la préparation des sulfures, 100 μL de l'échantillon sera prélevé systématiquement afin d'estimer la dilution à effectuer. Puis la dilution, si nécessaire, sera faite avant ajout des réactifs.

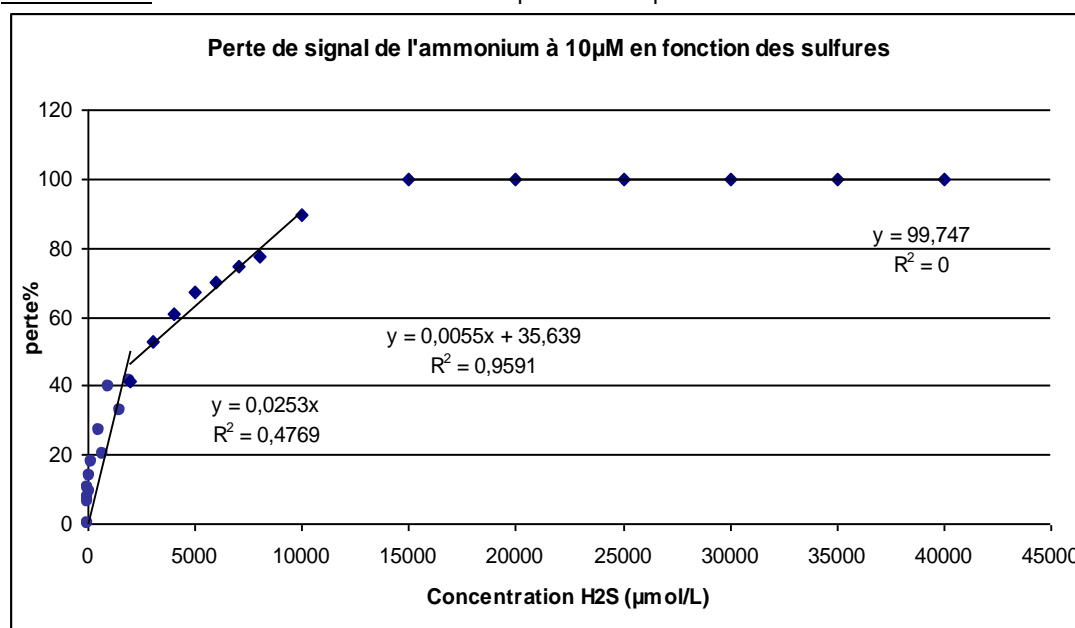
Pour les prochaines campagnes des aliquotes devront être prélevés pour limiter les erreurs de volumes et les contaminations éventuelles.

L'effet des sulfures sur le signal de fluorescence pour la mesure d'ammonium dans les eaux, est très important. Nous proposons donc une correction de type $y = ax$ jusqu'à 2mM de sulfures puis une autre de type $y = ax + b$ entre 2 et 10mM. Compte tenu de la perte importante, il sera préférable de se trouver entre 0 et 2mM de sulfures dans l'échantillon au risque que la dilution soit trop importante pour les teneurs en ammonium.

4. Annexe n° 1 : Résultats de l'ammonium en présence de sulfures

4.1. Test avec 10µM d'ammonium

Témoins	Na2S µmol/L	Fluo moy	Ecart type	perte	%perte
Te 0	0	0,0988	0,0000	0	0,0
Te 1	4	0,0914	0,0040	0,0074	7,5
Te 2	10	0,0928	0,0006	0,0060	6,1
Te 3	25	0,0884	0,0001	0,0105	10,6
Te 4	50	0,0895	0,0011	0,0093	9,4
Te 5	100	0,0853	0,0022	0,0136	13,7
Te 6	200	0,0814	0,0008	0,0175	17,7
Te 7	500	0,0723	0,0018	0,0266	26,9
Te 8	750	0,0789	0,0001	0,0199	20,1
Te 9	1000	0,0596	0,0007	0,0392	39,7
Te 10	1500	0,0665	0,0012	0,0324	32,7
Te 11	2000	0,0580	0,0017	0,0408	41,3
Te 12	3000	0,0469	0,0015	0,0520	52,6
Te 13	4000	0,0384	0,0021	0,0604	61,1
Te 14	5000	0,0325	0,0011	0,0664	67,2
Te 15	6000	0,0294	0,0002	0,0695	70,3
Te 16	7000	0,0253	0,0004	0,0735	74,4
Te 17	8000	0,0222	0,0004	0,0766	77,5
Te 18	10000	0,0103	0,0002	0,0886	89,6
Te 19	15000	0,0003	0,0002	0,0986	99,7
Te 20	20000	0,0003	0,0002	0,0986	99,7
Te 21	25000	0,0003	0,0002	0,0986	99,7
Te 22	30000	0,0003	0,0002	0,0986	99,7
Te 23	35000	0,0003	0,0002	0,0986	99,7
Te 24	40000	0,0003	0,0002	0,0986	99,7

Tableau n° 10 : Résultats des échantillons de 10µM NH₄⁺ dopées en sulfuresFigure n° 8 : Perte du signal pour 10µM NH₄⁺ en fonction de la concentration en sulfures

4.2. Test avec 25µM d'ammonium

Témoins	Na2S µmol/L	Fluo moy	Ecart type	perte	%perte
Te 0	0	0,2205	0,0000	0	0,0
Te 1	4	0,2098	0,0064	0,0108	4,9
Te 2	10	0,2121	0,0037	0,0084	3,8
Te 3	25	0,2081	0,0063	0,0125	5,6
Te 4	50	0,2070	0,0045	0,0136	6,1
Te 5	100	0,2024	0,0030	0,0182	8,2
Te 6	200	0,1940	0,0037	0,0265	12,0
Te 7	500	0,1717	0,0042	0,0488	22,1
Te 8	750	0,1748	0,0022	0,0458	20,7
Te 9	1000	0,1415	0,0006	0,0791	35,9
Te 10	1500	0,1433	0,0027	0,0772	35,0
Te 11	2000	0,1257	0,0006	0,0949	43,0
Te 12	3000	0,1054	0,0000	0,1151	52,2
Te 13	4000	0,0868	0,0006	0,1338	60,7
Te 14	5000	0,0736	0,0010	0,1469	66,6
Te 15	6000	0,0638	0,0007	0,1567	71,1
Te 16	7000	0,0557	0,0001	0,1648	74,7
Te 17	8000	0,0525	0,0005	0,1681	76,2
Te 18	10000	0,0274	0,0001	0,1932	87,6
Te 19	15000	0,0115	0,0029	0,2091	94,8
Te 20	20000	0,0080	0,0028	0,2126	96,4
Te 21	25000	0,0059	0,0030	0,2146	97,3
Te 22	30000	0,0054	0,0030	0,2152	97,6
Te 23	35000	0,0063	0,0049	0,2143	97,2
Te 24	40000	0,0057	0,0033	0,2149	97,4

Tableau n° 11 : Résultats des échantillons de 25µM NH4+ dopées en sulfures

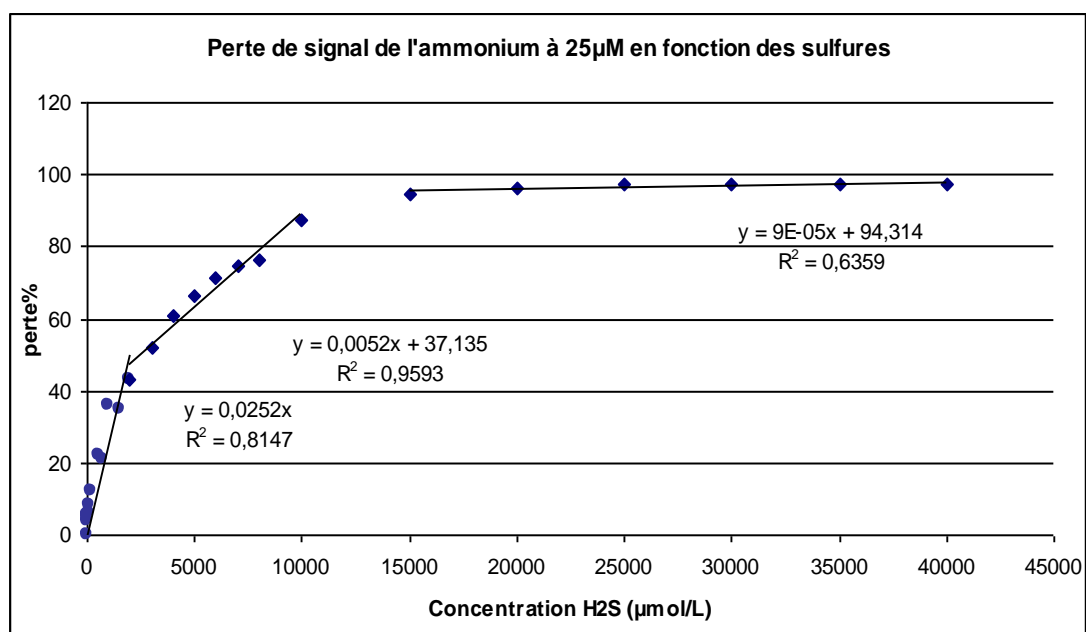
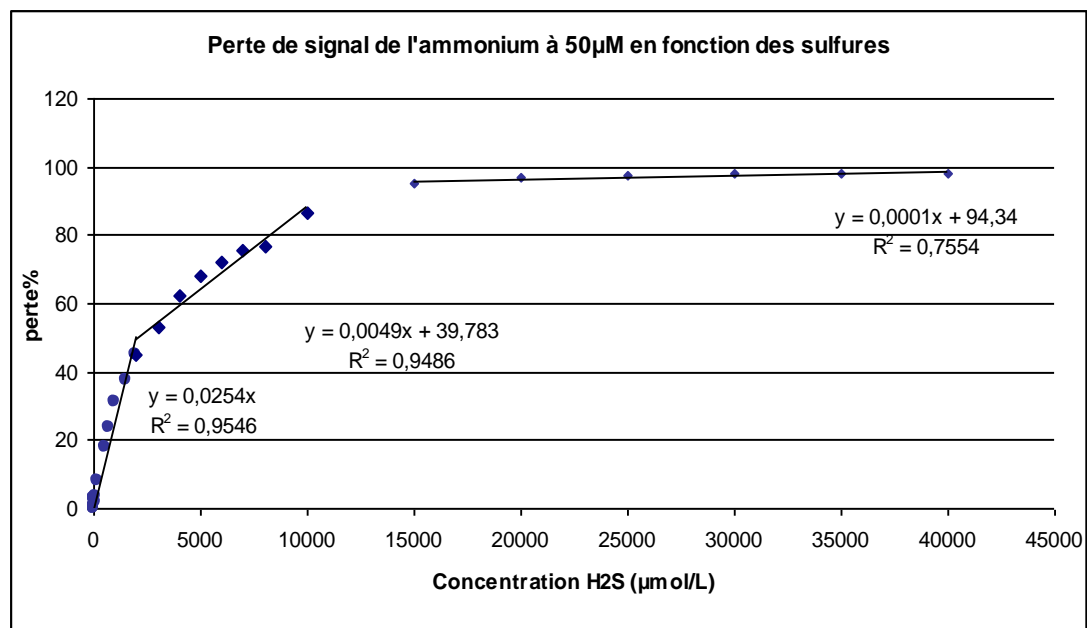


Figure n° 9 : Perte du signal pour 25µM NH4+ en fonction de la concentration en sulfures

4.3. Test avec 50µM d'ammonium

Témoins	Na2S µmol/L	Fluo moy	Ecart type	perte	%perte
Te 0	0	0,3876	0,0000		0
Te 1	4	0,3904	0,0042	0,0000	0,0
Te 2	10	0,3763	0,0029	0,0114	2,9
Te 3	25	0,3852	0,0166	0,0025	0,6
Te 4	50	0,3809	0,0135	0,0067	1,7
Te 5	100	0,3732	0,0141	0,0145	3,7
Te 6	200	0,3555	0,0076	0,0322	8,3
Te 7	500	0,3190	0,0023	0,0686	17,7
Te 8	750	0,2966	0,0029	0,0911	23,5
Te 9	1000	0,2670	0,0041	0,1206	31,1
Te 10	1500	0,2427	0,0021	0,1449	37,4
Te 11	2000	0,2133	0,0002	0,1744	45,0
Te 12	3000	0,1813	0,0000	0,2063	53,2
Te 13	4000	0,1457	0,0008	0,2420	62,4
Te 14	5000	0,1239	0,0001	0,2637	68,0
Te 15	6000	0,1092	0,0005	0,2785	71,8
Te 16	7000	0,0958	0,0004	0,2919	75,3
Te 17	8000	0,0909	0,0002	0,2968	76,6
Te 18	10000	0,0518	0,0012	0,3359	86,6
Te 19	15000	0,0189	0,0002	0,3688	95,1
Te 20	20000	0,0126	0,0001	0,3750	96,7
Te 21	25000	0,0094	0,0004	0,3783	97,6
Te 22	30000	0,0081	0,0001	0,3796	97,9
Te 23	35000	0,0078	0,0001	0,3799	98,0
Te 24	40000	0,0078	0,0004	0,3799	98,0

Tableau n° 12 : Résultats des échantillons de 50µM NH₄⁺ dopés en sulfuresFigure n° 10 : Perte du signal pour 50µM NH₄⁺ en fonction de la concentration en sulfures

5. Bibliographie

- Aminot, A., K erouel, R., 2007. Dosage automatique des nutriments dans les eaux marines. Methode d'analyse en milieu marin. Ifremer, Quae, p 114-122.
- Aminot, A., K erouel, R., Birot D., May 2001. A flow injection-fluorometric method for the determination of ammonium in fresh and saline waters with a view to in situ analyses. Water Research 35, p 1777-1785.
- De Prunel  A., Caprais J.C., 2010. *D termination du flux d'oxyg ne   l'interface eau-s diment   l'aide de micro- lectrodes. D termination de l'azote ammoniacal par fluorescence.* Rapport de stage Ifremer DEEP/LEP 10-02, Master 1 Sciences Chimiques de l'Environnement Marin. 20p
- Fonselius, S.H., 1983. Determination of hydrogen sulfide. In : Grasshof, K. (Ed.), *Methodes of sea-water analysis.* Verlag Chemie, Kiel, p 73-84.
- Holmes, R.M., Aminot, A., Kerouel, R., Hooker, B.A., Peterson, B.J., 1999. A simple and precise method for measuring ammonium in marine and freshwater ecosystems. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 56 (10), p 1801-1808.
- K erouel, R., Aminot, A., 1997. Fluorometric determination of ammonia in sea and estuarine waters by direct segmented flow analysis. *Marine Chemistry* 57, p 265-275.
- Le Bruchec J., Caprais J.C., 2011. Mesure des sulfures dans des  chantillons d'eau et calibration des solutions m res de sulfures, mesure par spectrophotom trie d'absorption. Rapport REM-EEP-LEP 11-23, Ifremer. p 4-14.